

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-026623

(43)Date of publication of application : 27.01.1998

(51)Int.Cl.

G01N 33/576

G01N 33/53

G01N 33/68

(21)Application number : 08-180448

(71)Applicant : YAMAGUCHI MASAYOSHI  
DAI ICHI PURE CHEM CO LTD

(22)Date of filing : 10.07.1996

(72)Inventor : YAMAGUCHI MASAYOSHI

## (54) METHOD FOR DIFFERENTIATING SERUM OF HEPAR DISEASE PATIENT

## (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To perform explicit differentiation of a hepar disease patient by measuring the regucalcin in serum.

SOLUTION: The measurement of the regucalcin in serum is not especially limited. For example, in the case of an FLISA method, IgG of anti-regucalcin is solidified in an immuno-plate. The regucalcin of various kinds of concentration of calibration curves or the patient's serum is bonded thereto. Furthermore, IgG of the regucalcin for a biotin label and strepto a vidin for peroxidase mark are bonded. Then, coloring is measured by a coloring substrate. The concentration of the patient's serum can be computed by the calibration curves. Furthermore, the anti-regucalcin antibody can use either of a polyclonal antibody and the anti-regucalcin monoclonal antibody, which is formed from hydridoma for forming the anti-regucalcin antibody.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 18.08.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 06.11.2001

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-26623

(43)公開日 平成10年(1998) 1月27日

(51)Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N	33/576		G 0 1 N 33/576	Z
	33/53		33/53	D
	33/68		33/68	

審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 3 頁)

(21)出願番号 特願平8-180448

(22)出願日 平成 8 年(1996) 7 月10日

(71)出願人 593204502  
山口 正義  
静岡県静岡市瀬名川1239番地の1  
(71)出願人 390037327  
第一化学薬品株式会社  
東京都中央区日本橋 3 丁目13番 5 号  
(72)発明者 山口 正義  
静岡県静岡市瀬名川1239番地の1  
(74)代理人 弁理士 有賀 三幸 (外 3 名)

(54)【発明の名称】 肝疾患患者血清の鑑別方法

(57)【要約】

【解決手段】 血清中のレギュカルチンを測定することによる肝疾患患者血清の鑑別方法。

【効果】 肝疾患患者の血清を漏れなく鑑別することが可能である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 血清中のレギュカルチンを測定することを特徴とする肝疾患患者血清の鑑別方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、肝機能マーカーとして肝臓に局在する $\text{Ca}^{2+}$ 結合蛋白質であるレギュカルチンを測定することによる肝疾患患者血清の鑑別方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 肝機能マーカーとしては、従来、GOT、GPT等の酵素の血中への漏洩を指標としてきた。しかし、これらの酵素は肝臓に特異的に存在するものではなく、健常人の血清であってもある程度の数値を示すため、これらのみから明確に判断することは困難で、ときにGOTやGPTのデータ的には正常値を示す肝疾患患者を見落す場合などがあった。従って、従来は複数の指標から総合的に判断せざるを得なかった。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】 このようなことから、肝疾患患者の血清を明確に鑑別し得る方法の提供が望まれる。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】 ところで、レギュカルチンは、ラット肝細胞質から単離された新しい $\text{Ca}^{2+}$ 結合蛋白質であり、等電点はpH5.20、 $\text{Ca}^{2+}$ 結合定数は $4.19 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ を示し、6~7個の高親和性 $\text{Ca}^{2+}$ 結合部位を持ち、 $\alpha$ -ヘリックス構造を34%含んでいる。レギュカルチンは、 $\text{Ca}^{2+}$ が結合すると構造がルーズになるという特徴を有する。また、レギュカルチンは $\text{Ca}^{2+}$ による肝臓の酵素の活性化を制御していることが知られており、 $\text{Ca}^{2+}$ による細胞内情報伝達系の制御因子としての役割を果たしているものである。

【0005】 このレギュカルチンは、GOT、GPT等の既存の肝機能マーカーと異なって肝臓に特異的に存在するのであり、また上記生理的役割を果たしていることから、本発明者はレギュカルチンの肝機能マーカーとしての可能性について鋭意検討を重ねた結果、肝疾患患者の血清ではレギュカルチンが有意に上昇している一方、健常人の血清ではレギュカルチンはほとんど検出されず、その測定が肝疾患患者血清の鑑別手段として有用であることを見出し、本発明を完成した。

【0006】 すなわち本発明は、血清中のレギュカルチンを測定することを特徴とする肝疾患患者血清の鑑別方法を提供するものである。

## 【0007】

【発明の実施の形態】 本発明において、血清中のレギュカルチンの測定方法は特に限定されず、ELISA法、RIA法、EIA法等、通常的手段により行うことができる。例えばELISA法による場合では、抗レギュカルチン抗体を

固相化し、そこに被検血清を結合させ、次いで標識抗レギュカルチン第2抗体を結合させた後、結合した標識抗体を測定することにより行われる。より具体的には、イムノプレートに抗レギュカルチンIgGを固相化し、そこに検量線用の種々の濃度のレギュカルチンあるいは患者血清を結合させ、更にビオチン標識抗レギュカルチンIgG及びペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを結合させた後、発色基質にて発色測定し、検量線より患者血清の濃度を算出することができる。また、抗レギュカルチン抗体としては、ポリクローナル抗体、抗レギュカルチン抗体産生ハイブリドーマから作製された抗レギュカルチンモノクローナル抗体のいずれを用いることもできる。

## 【0008】

【実施例】 以下、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。なお、実施例に用いた試薬等は全て市販のものである。ただし、抗レギュカルチン抗体は精製したレギュカルチンをウサギに免疫し作製したものである。

## 【0009】 実施例1

(抗レギュカルチンIgGの作製) プロテインAカラムを0.15Mリン酸緩衝生理食塩水(pH7.2)で平衡化した後、 $0.45 \mu\text{m}$ のフィルターでろ過した抗レギュカルチン血清を注入した。非吸着画分溶出液の吸光度がベースラインに戻るまで0.15Mリン酸緩衝生理食塩水(pH7.2)で洗浄した。洗浄後、0.1Mグリシン緩衝液(pH7.2)でIgG分画を溶出した。溶出液は1Mトリス溶液で中和した。得られたIgG分画は蒸留水にて一晚透析後、凍結乾燥して使用時まで $-70^\circ\text{C}$ に保存した。

【0010】 (ビオチン標識抗レギュカルチンIgGの作製) 抗レギュカルチンIgG 10mgを、5mlの0.05M重碳酸緩衝液(pH8.5)に溶解後、NHS-LC-Biotin 3.7mgを添加して $37^\circ\text{C}$ で1時間反応することにより、ビオチンを抗レギュカルチンIgGに結合させた。反応終了後、0.01Mリン酸緩衝生理食塩水(pH7.4)で一晩透析した後、0.4%ブロッカーで1mg protein/mlに調整して使用時まで $-70^\circ\text{C}$ で凍結保管した。

【0011】 (レギュカルチン濃度の測定) 抗レギュカルチンIgGを5mlの蒸留水で溶解後、0.1M炭酸緩衝液(pH9.7)で $30 \mu\text{g/ml}$ に希釈し、96穴インキュベーターに $50 \mu\text{l}$ ずつ分注後、 $37^\circ\text{C}$ で2時間インキュベートすることにより、抗レギュカルチンIgGをイムノプレートに固相化した。固相化終了後、0.05% Tween20を含む0.01Mリン酸緩衝生理食塩水(pH7.4) (以下、「TPBS」と略す)で3回洗浄した。次に、1%ブロッカー溶液を各ウェルに $250 \mu\text{l}$ ずつ分注し、 $37^\circ\text{C}$ で1時間インキュベートすることによりブロッキングを行った。ブロッキング終了後、TPBSで3回洗浄し、0.4%ブロッカーで1~15ng/mlに調整したレギュカルチン及び2倍又は10倍に希釈した肝疾患患者血清を $50 \mu\text{l}$ ずつ分注し、 $4^\circ\text{C}$

で一晩インキュベートした。インキュベート終了後、TPBSで3回洗浄し、ビオチン標識抗レギュカルチンIgGを0.4%ブロックエース溶液で30 $\mu$ g/mlに調整して各ウェルに100 $\mu$ lずつ分注後、37°Cで2時間インキュベートを行った。インキュベート終了後、TPBSで3回洗浄し、0.4%ブロックエース溶液で10,000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを各ウェルに100 $\mu$ lずつ分注し、37°Cでインキュベートした。インキュベート後、TPBSで5回洗浄し、基質溶液[o-フェニレンジアミンを0.1Mナトリウムリン酸クエン酸緩衝液(pH5.0)で3mg/mlに希釈し、30%過酸化水素水を20 $\mu$ l/100mlになるように加えたもの]を各ウェルに100 $\mu$ lずつ添加後、\*

\*室温で15分間酵素反応を行った。酵素反応の停止は、4N硫酸を各ウェルに100 $\mu$ lずつ添加後、プレートミキサーで攪拌することにより行った。吸光度の測定はEIAリーダーにて検出波長492nmで行った。既知の濃度のレギュカルチンで検量線を作成し、肝疾患患者血清中のレギュカルチン濃度を算出した。

【0012】かくして得られた健常人及び肝疾患患者の血清中のレギュカルチン濃度を表1に示す。参考のため、GOT値及びGPT値も常法に従い測定し、表1に併せて示した。

【0013】

【表1】

No.	性別	病名	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	レギュカルチン (ng/ml)	No.	性別	病名	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	レギュカルチン (ng/ml)
1	男	正常	15	9	検出限界以下	25	女	C	37	32	11
2	男	正常	21	12	検出限界以下	26	女	C	43	65	33.1
3	男	正常	17	13	検出限界以下	27	男	C	19	14	13.2
4	女	正常	18	14	検出限界以下	28	女	J	29	23	10.8
5	女	正常	18	15	検出限界以下	29	男	K	22	22	4.5
6	女	正常	18	18	検出限界以下	30	男	F	71	96	33.3
7	女	正常	19	16	検出限界以下	31	男	H	32	26	11.9
8	女	F	67	93	8.6	32	男	H	36	32	4
9	女	H	136	85	13.4	33	女	K	15	9	15.4
10	女	F	118	118	4.9	34	男	K	28	28	8.4
11	男	E	44	94	80.6	35	男	F	50	67	8.5
12	男	C	19	22	9.4	36	女	A	17	13	41
13	男	A	19	15	12	37	男	J	43	78	8.9
14	男	I	53	67	6.4	38	女	G	151	220	26.9
15	女	C	34	26	6.5	39	女	F	52	49	16.6
16	男	F	81	132	11.2	40	女	F	90	92	12.4
17	女	C	37	37	20.4	41	男	C	43	54	54.5
18	男	C	34	91	6.1	42	男	C	69	113	18.6
19	女	I	208	136	22.7	43	男	F	79	127	2.5
20	男	C	36	47	14.7	44	男	F	48	75	4.2
21	男	D	26	52	7	45	女	F	160	210	12.7
22	男	H	102	108	9.3	46	男	F	84	234	9.8
23	女	B	13	9	16	47	女	F	227	371	11.7
24	男	I	51	36	69.6	48	男	F	56	95	7.3
						49	男	F	107	111	3.7

A ; Asymptomatic carrier

C ; Chronic inactive hepatitis

E ; Chronic active hepatitis 2B

G ; Chronic hepatitis B

I ; Hepatocellular carcinoma + LC

K ; Others

B ; Hepatitis after blood transfusion

D ; Chronic active hepatitis 2A

F ; Chronic active hepatitis 2A or 2B

H ; Liver cirrhosis(LC)

J ; Autoimmune hepatitis

【0014】健常人の血清中のGOT値は10~38U/l、GPT値は4~35U/lであるが、肝疾患患者の中には有意に高値を示さず正常範囲のものがあつた。これに対し、肝疾患患者の血清中のレギュカルチン濃度は明らかに上昇している一方、健常人の血清中のレギュカルチン濃度は検

出限界(0.5ng/ml)以下であり、肝疾患患者と健常人の血清を明確に鑑別できた。

【0015】

【発明の効果】本発明方法によれば、肝疾患患者の血清を漏れなく鑑別することが可能である。